

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

of lignin glycoside.

4. A cytokine production inducing agent mainly composed of lignin glycoside.

5. A cancer immunotherapeutic agent mainly composed of lignin glycoside.

3. Detailed Description of the Invention

[Industrial Field of Utilization]

The present invention relates to a novel lignin glycoside and its use.

[Prior Art - Problems to be Solved by the Invention]

Almost all existing anticancer drugs have the action of suppressing DNA synthesis or cell division, but present similar actions also to normal cells. By making use of a slight difference that the cancer cells are fast in cell division while normal cells are slow, treatment is established by giving more damages to cancer cells. Damages received by normal cells are expressed as side effects, and it is an important point in cancer treatment how far the body can withstand such side effects.

By nature, cancer treatment should be based on biology and biochemistry of cancer cells, but actually such cancer therapy is not realized yet.

As causes of cancer, traditionally, carcinogen, radiation and virus have been pointed out, and it has been clarified that cells are turned cancerous by the gene information of the cancer virus, and the term "oncogene" has been coined. It was later hypothesized that the oncogene is present also in normal cells and is switched on by some cause to make the cells cancerous. As the hypothesis was discussed and proved further, and the hypothesis is generally accepted nowadays.

In genomes of higher animals, there are 50 kinds or more proto-oncogenes that can be oncogenes, and they play important physiological functions in proliferation and differentiation of normal cells. Therefore it gives rise to possibility of control of cell proliferation or control of cancer at the level

of genes or at the level of gene products. It is an object of the invention to develop a cancer remedy capable of suppressing the stage of expression of oncogene by a specific inhibitor. Using mouse mammary tumor cells of which expression of inserted mouse mammary tumor virus (MMTV) is controlled by corticoid, it has been discovered that expression of MMTV gene is triggered by de-poly-ADP-ribose reaction in chromatin protein. That is, as poly-ADP-ribose is decomposed, the local change of chromatic structure is considered to be finally related to promotion of bonding and transfer of RNA polymerase to promoter [Journal of Biological Chemistry, 258: 15371 (1983)].

Accordingly, the present inventor expected that the oncogene would not be activated if decomposition of poly-ADP-ribose could be inhibited, and hence isolated and refined poly-(ADP-ribose) glycohydrolase which is an enzyme responsible for decomposition of ADP-ribose from the human placenta, and searched for compounds having an inhibitory action on this enzyme, and then discovered a potent inhibitory activity in certain natural compounds.

Moreover, such compounds were found to have completely new activities for intensifying the cell killing action and cell division inducing action possessed by the tumor necrosis factor (TNF), and this intensifying effect was discovered to be derived from heightening of bonding affinity of TNF to the TNF receptor. Still more, the compounds were known to have an action of inducing production of TNF and interleukin I from macrophage. By further promoting the investigation, a novel compound usable as a pharmaceutical having an anticancer action based on poly-(ADP-ribose) glycohydrolase inhibition, and TNF and other cytokine induction and their action intensifying effect was discovered, and the invention was completed.

[Means of Solving the Problems]

That is, the invention is characterized by the following.

1. A lignin glycoside having the following properties.
 - (i) Lignin and polysaccharide are bond d.
 - (ii) The molecular weight is 60000 to 140000.

(iii) The bonding ratio of lignin and polysaccharide is 1:1 to 20:1 (molecular ratio).

(iv) Polysaccharide is composed of 60 to 70% of uronic acid, and 30 to 40% of neutral sugar.

2. A poly-(ADP-ribose) glycohydrolase inhibitor mainly composed of lignin glycoside.

3. A cytokine, that is, tumor necrosis factor (TNF) action intensifying agent mainly composed of lignin glycoside.

4. A cytokine (TNF, IL-1) production inducing agent mainly composed of lignin glycoside.

5. A cancer immunotherapeutic agent (by combined use with TNF or other cytokine) mainly composed of lignin glycoside.

The lignin glycoside of the invention is a bonded composition of lignin and sugar (polysaccharide). Lignin and sugar (polysaccharide) are bonded by ether bonding. The bonding ratio of lignin: constituent sugar is, for example, about 1: 3 to 5 by weight. The molecular ratio of lignin and polysaccharide is, for example, about 1 to 20: 1.

The sugar component of lignin glycoside is composed of uronic acid and neutral sugar. The composition is, for example, about 60 to 70% of uronic acid, and 30 to 40% of neutral sugar.

The neutral sugar includes glucose, galactose, mannose and arabinose. The composition is, for example, about 15 to 20 mol % of glucose, 25 to 30 mol % of galactose, 35 to 50 mol % of mannose, and 10 to 15 mol % of arabinose.

These constituent sugars have a structure of saccharides on the whole, and form a polysaccharide.

The molecular weight of lignin glycoside is about 80000 to 140000, and the molecular weight of polysaccharide portion is about 40000 to 100000. The molecular weight of lignin portion is about 1000 to 10000.

The lignin glycoside of the invention is composed of the following elements: for example, about 35 to 45 wt.% of C atom, 1 to 10 wt.% of H atom, and 45 to 64 wt.% of O atom.

The lignin glycoside of the invention is prepared in the

following manner.

The starting material includes, for example, tea (leaves, twigs), lithospermum root, trisaccharide root, ginseng, pine (cones, leaves), grass dogwood (stem).

The material is treated in the solvent (for example, hot water, ethanol, acetone). The treating time is about 1 to 15 hours. The treated material is extracted in an alkaline solution (0.1 to 1N sodium hydroxide, ammonium, etc.). The extracted liquid is adjusted to pH 4 to 6, and ethanol is added by 1 to 5 times in amount, and the precipitation fraction is recovered. The precipitation fraction is refined by gel filtration, and the active portion is recovered.

Thus obtained lignin glycoside can be treated by dialysis, centrifugal separation, freeze-drying, etc.

The lignin glycoside of the invention has poly-(ADP-ribose) glycohydrolase inhibitory action, and TNF production induction and intensifying effect of its action, and presents poly-(ADP-ribose) glycohydrolase inhibitory activity, and TNF production induction and intensifying activity of its action to mammals including humans (human, horse, dog, mouse, guinea pig, rat, etc.), and is useful for treatment and prevention of malignant tumor and viral infection as poly-(ADP-ribose) glycohydrolase inhibitor, and TNF production induction and its action intensifying active agent.

The lignin glycoside of the invention is administered either orally or parenterally.

The lignin glycoside is administered either alone or in a form of pharmaceutical preparation together with a pharmaceutically allowable carrier. The preparation is manufactured by a known method. The dosage forms include tablet, capsule, powder, suppository, injection, etc.

The lignin glycoside is administered, for example, by oral route, usually by about 0.1 to 100 mg/kg of body weight a day either once or in several divided portions, but the dose may be changed depending on the age, body weight and/or severity of the disease to be treated and reaction to treatment.

Toxicity test

The toxicity of the lignin glycoside of the invention in mice was investigated, and, by oral administration, the LD₅₀ value was 100 mg/kg or more, and the LD₅₀ value was extremely high, and this is a compound with a broad safety region.

[Embodiments]

Embodiment 1

The lignin glycoside was extracted in the following operation.

Example

Pinecone

↓

Extraction in hot water

The boiling time varies with the amount of pinecones or amount of water, but is usually 2 hours x 3 times.

Extraction in ethanol

Pinecones extracted in hot water are half dried, and immersed in ethanol, and let stand overnight at room temperature.

Extraction in acetone

Pinecones extracted in ethanol are half dried, and immersed in acetone, and let stand overnight at room temperature.

Extraction in 0.3N sodium hydroxide (or ammonia) solution

Pinecones extracted in acetone are dried by lamp, and extracted in 0.3N sodium hydroxide solution while stirring for 6 hours (or overnight). Acetic acid is added to this extracted liquid, and the pH is returned to 5.0. The precipitate is removed by high speed centrifugal operation.

Precipitation in ethanol

An equivalent amount of ethanol is added to the extracted liquid, and let stand overnight in a cold room. The precipitate is collected by high speed centrifugal operation.

↓ The precipitate is dissolved in water and dialyzed in water.

Freeze-drying

The dialyzed solution is freeze-dried, and powder is
↓ obtained.

Gel filtration

The freeze-dried powder is refined by Sepharose CL-4B (the moving bed is 0.1 N NaOH). Active fractions are collected, acetic acid is added to return the pH to 5.0, and an equivalent amount of ethanol is added, and letting stand in ice for 1 to 2 hours, the precipitate is collected by high speed centrifugal operation. The precipitate is dissolved in 10% ethanol, and is further refined by Toyopearl HW-40F (the moving bed is 10% ethanol). Active fractions are collected, dialyzed in water, and freeze-dried, and powder is obtained.

Embodiment 2

To investigate the characteristic of the structure of sugar portion (glycone) and non-sugar portion (aglycone) of the lignin glycoside, the glycoside was separated into glycone and aglycone by methanolysis (decomposition into methanol and hydrochloric acid) or chlorite (NaClO_2) method, and analyzed. The results are as follows.

[Analysis of glycone]

Molecular weight: 60000 to 100000 by Sepharose CL-4B gel filtration method.

Composition of sugar a)	(%)	(total wt.%)
Uronic acid	63.4	48.8
Neutral sugar	36.6	28.2

It is a feature that 2/3 of glycone is Uronic acid.

Composition of neutral sugar b)	(mol %)
Glucose	18.2
Galactose	27.4
Mannose	40.2

Arabinose	13.8
Fucose	0

Neutral sugar contains glucose, galactose, mannose, and arabinose, but does not contain fucose.

a) Uronic acid was determined by carbazole method, and neutral sugar by phenol sulfate method.

b) The composition of neutral sugar was analyzed by gas chromatography after transforming methyl glycoside produced by methanolysis into trimethyl.

[Analysis of aglycone]

Molecular weight: 4000 ± 2000 by Sepharose CL-6B gel filtration method.

Analysis of infrared absorption (IR)

IR was measured by using KBr disk.

As a result, an absorption having a peak at 3400 cm^{-1} was detected in a range of 3500 to 3700 cm^{-1} . This absorption indicates the presence of phenolic hydroxyl group. The absorption around 1600 cm^{-1} shows an aromatic double bond. Since there is no absorption of carbonyl group around 1700 cm^{-1} , there is no ester bond as noted in tannin, and it is proved to be a compound polymerized by ether bond as observed in lignin.

Including the fingerprint region, the entire spectrum is extremely similar to that of lignin (alkali).

From the above results of IR spectrum, the aglycone of this glycoside is estimated to be a lignin-like compound, not, tannin-like compound.

Analysis of ultraviolet absorption (UV)

Maximum absorption was detected at 280 nm , and minimum absorption at 260 nm .

$$280/260 = 1.02$$

Lignin also has a similar UV spectrum.

$$280/260 = 1.03$$

The presence of aromatic group (probably phenol) is indicated by UV spectrum.

Analysis of electron spin resonance (ESR)

Same as in lignin, $g = 2.004$ ESR signal is detected, and it is known to contain a structure having a stable free radical. Such signal is not observed in tannin.

[Analysis of lignin glycoside]

The feature as the entire lignin glycoside is as follows.

Element analysis	(weight %)
C	39.83
H	4.41
O	55.73
N	0.03 or less
S	0

Since nitrogen and sulfur are not contained, it is free from protein and sulfate group, and the molecular weight by Sepharose CL-4B gel filtration method is about 110000.

The bonding ratio of lignin and sugar is about 1:4 by weight.

Therefore, it is a feature of this glycoside that it contains uronic acid by about 50% of the total weight as sugar component (glycone). The neutral sugar includes glucose, galactose, mannose, and arabinose. The non-sugar component (aglycone) is composed of lignin.

This glycoside is an O-glycoside having the reduction end lactol hydroxyl group of sugar bonded in ether form with alcoholic or phenolic hydroxyl group of lignin by dehydration and condensation. The bonding ratio of lignin and sugar is about 1:4 by weight, and in particular it is a lignin glycoside (as classified by the feature of aglycone) with molecular weight of about 110000 with a large content of uronic acid of acid sugar.

The estimated structural model of the glycoside is as shown in the diagram.

Test example 1

Inhibitory effect on poly-(ADP-ribose) glycohydrolase
To a buffer for assay (0.01% bovine serum albumin, 10 mM mercaptoethanol, 50 mM potassium phosphate, pH 7.0), ^3H -(ADP-ribose) $n=13$ was added, and to 27 μl thereof, further, the substance to be tested and nuclear derivative poly-(ADP-ribose)

glycohydrolase solution prepared from human placenta were added to make up 30 μ l in total, which was incubated for 1 hour at 37°C. Later, the reaction solution was absorbed in DE81 filter paper, and the filter paper was washed in water, ethanol and acetone, and was dried, and the unreacted substrate ^3H -(ADP-ribose) was measured by liquid scintillation counter, and the inhibitory action of the test substance on this enzyme was investigated. Results are shown in Table 1, which shows all tested substances inhibited poly-(ADP-ribose) glycohydrolase dose-dependently.

Table 1

Inhibitory activity of lignin glycoside on poly-(ADP-ribose) glycohydrolase

Concentration of lignin glycoside ($\mu\text{g/ml}$)	Activity of poly-(ADP-ribose) glycohydrolase (%)
0	100
1	83
3	48
10	17
30	8

Test example 2

Inhibitory effect on gene expression

The gene expression system used in the test was 341 strains of mouse mammary tumor cells having mouse mammary tumor virus (MMTV) genes which are saccharide corticoid susceptible genes. The cell, in the presence of saccharide corticoid, expresses 35S RNA, and 24S RNA further undergoing splicing. This expression can be detected by using cDNA of the env portion. Herein, the test substance was added to 341 strains by 30 $\mu\text{g/ml}$, and incubated for 30 minutes at 37°C, and dexamethazone was added to the system by 10^{-7}M , and it was further incubated for 1 hour. Then, 341 cells were collected, high molecular RNA was extracted by guanidine-hydrochloric acid method, and after treating for 5 minutes at 60°C (20 mM MDPS, pH 7.0, 5 mM sodium sulfate, 1

mM EDTA), electrophoresis was conducted (40 V, 16 h) by 1.2% agarose gel (same buffer). Consequently, transferring to nitrocellulose, ^{32}P -MMTV-DNA (cDNA specific to env) was hybridized, and an autoradiogram was prepared by X-ray film. Using the autoradiogram, the concentration of 35S and 24S RNA bands was measured by densitometer, and the RNA expression amount was determined, and the result was compared with the control without addition of test substance, and the RNA expression inhibitory rate was calculated. As the result is shown in Table 2, the test substance presented the MMTV gene expression inhibitory action.

Table 2

Action of lignin glycoside on expression of mouse mammary tumor virus (MMTV) gene

	Dexamethazone (10^{-7}M)	Lignin glycoside (30 $\mu\text{g/ml}$)	Sensitivity of 35S, 24S bands
1	+	-	++++
2	-	+	+
3	-	-	+
4	+	+	++

1: positive control, 2 and 3: negative control, 4: test group
Test example 3

Carcinostatic effect on mouse experimental tumor

In the abdominal cavity of mouse, 1×10^6 tumor cells of sarcoma 180 were transplanted, and the test substance was continuously administered intraperitoneally for 1 to 4 days after transplantation. The antitumor activity was determined by the survival rate by comparison with the normal saline administration group. The experiment was terminated on the 45th day after tumor transplantation. The results are shown in Table 3, and the test substance presented a carcinostatic action.

Table 3

Carcinostatic action of lignin glycoside on mouse tumor sarcoma

180

Sample	Dose (mg/kg)	T/C (%)
None		100
Lignin glycoside	40X4	108
	20X4	206
	10X4	120
	5X4	91

The lignin glycoside was administered for 4 days consecutively from the day after transplantation.

Test example 4

Intensifying effect of TNF action on mouse fibroblastoma cell L-929

The cell killing action of TNF can be evaluated by measuring the stain concentration by staining the surviving viable cells by making use of adhesion of L-929 cells to Petri dish. Accordingly, the test substance was added to L-929 cells, actinomycin D was added by 4 µg/ml, and further TNF was added to incubate for 18 hours at 37°C. The plate was washed in normal saline, and dead cells were removed. Then viable cells were stained with 0.1% crystal violet, the stained viable cells were dissolved in 0.5% SDS, the pigment concentration was measured at OD 590 nm, and the intensifying effect on TNF action was studied. The results are shown in Table 4, in which all test substances intensified the cell killing action of TNF dose-dependently.

Table 4

Intensifying effect of TNF action on mouse fibroblastoma cell L-929

Lignin glycoside concentration (µg/ml)	CD ₅₀ concentration of TNF(g/ml)	Intensifying factor(%)
0	0.034	100

3	0.015	221
10	0.0062	548
30	0.0044	773
100	0.0074	458

Test example 5

Carcinostatic effect by combined use of TNF on mouse experimental tumor

By transplanting 1×10^6 cells of sarcoma 180 tumor subcutaneously in mice, the test substance and TNF were consecutively administered for 1 to 5 days after transplantation. The antitumor activity was determined by the survival rate by comparison with saline administration group. The experiment was terminated on 45th day after transplantation. The results are shown in Table 5, and the test substance presented a potent carcinostatic effect by concomitant use of TNF.

Table 5

Effect of concomitant use of lignin glycoside and TNF on mouse tumor sarcoma 180

Sample	Concentration (mg/kg)	T/C (%)
0		100
TNF		118
TNF+	40X4	191
Lignin glycoside	20X4	298
	10X4	254
	5X4	188

Lignin glycoside was administered, together with TNF, for 4 days consecutively from the day after transplantation.

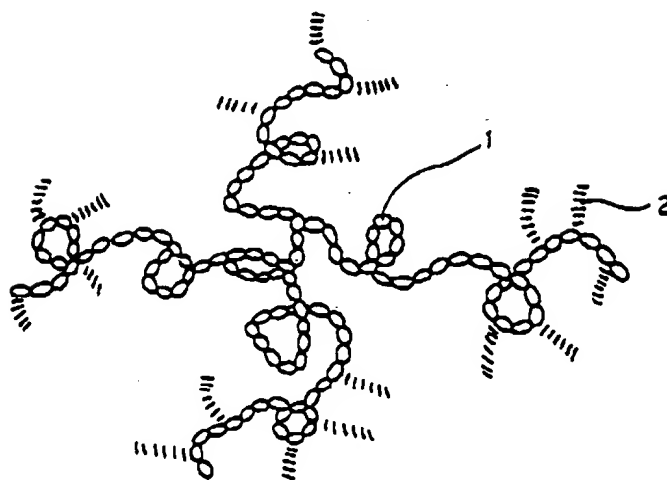
4. Brief Description of the Drawing

The drawing shows the estimated structure of the lignin glycoside of the invention.

- 1: Sugar
- 2: Lignin

Applicant: The Green Cross Corp.

Attorney: Hajime Takashima, patent attorney



日本国特許庁(JP)

④特許出願公開

⑤公開特許公報(A) 平3-205402

⑥Int. Cl.⁷

識別記号

庁内整理番号

⑧公開 平成3年(1991)9月6日

C 08 B 37/00
A 61 K 31/725

Q

7824-4C

ADU
AED

7431-4C

審査請求 未請求 請求項の数 5 (全7頁)

⑨発明の名称 リグニン配糖体およびその用途

⑩特 願 平2-113048

⑪出 願 平2(1990)4月28日

優先権主張 ⑫平1(1989)10月28日⑬日本(JP)⑭特願 平1-280398

⑯発 明 者 田 沼 靖 一 東京都八王子市小門町1-10

⑰出 願 人 株式会社ミドリ十字 大阪府大阪市中央区今橋1丁目3番3号

⑱代 理 人 弁理士 高 島 一

明 細 書

1. 発明の名称

リグニン配糖体およびその用途

2. 特許請求の範囲

(1) 以下の性質を有するリグニン配糖体、

(1) リグニンおよび多糖類が結合

(2) 分子量は80000~140000

(3) リグニンと多糖類の割合は1:1~20
:1(分子比)

(4) 多糖類はウロン酸50~70%、中性糖30~40%で構成されている。

(2) リグニン配糖体を主成分とするポリ(ADP-リボース)グリコヒドロラーゼ阻害剤。

(3) リグニン配糖体を主成分とするサイトカイン作用の増進剤。

(4) リグニン配糖体を主成分とするサイトカイン産生の誘発剤。

(5) リグニン配糖体を主成分とする癌免疫増進剤。

3. 発明の詳細な説明

(最善上の利用分野)

本発明は新規なリグニン配糖体およびその用途に関する。

(従来技術・発明が解決しようとする課題)

癌等の疾患用の薬とは、DNA合成あるいは癌細胞増殖を抑制する作用を持つが、これは正常細胞に対しても同等の作用を示す。わずかに癌細胞は癌細胞が増え、正常細胞は減っていくという差を利用して、癌細胞に、より多くの障害を与えることで治療が成り立っている。正常細胞が受けた障害は、副作用として現われ、生体がその副作用にどこまで耐えられるかが、癌治療の上で重要なポイントとなっている。

以上の様に、従来の癌治療は癌細胞の増殖や、生化学などに阻害するものであるが、現実にはその様な癌治療にまで結びついていない。

さて、癌の原因と言うと免疫障害、放射線およびウイルスの3つがよく知られてきた。その内、癌ウイルスの持つ遺伝情報により細胞が癌化するところが明らかになり、oncogene(癌遺伝子)なる言葉が生まれた。その後、癌遺伝子は正常細胞

特 許 平 3-205402(2)

能にも存在し、それがある時スイッチオンされて、細胞が癌化すると云う仮説が立てられたのである。これは、時の流れと共に発展し、今日その大筋は正しくなることを望んでもおかしくないことである。

一方、高等動物のゲノムには遺伝因子と云うものがある。その数は1000以上存在し、それらは正常細胞の増殖や分化に必要な生体機能を果たしている。それ故、癌腫増殖や癌の細胞の遺伝子のレベルもしくは遺伝子発現のレベルでのコントロールの可能性が生れて来た。本発明は遺伝因子発現の調節を、特異的阻害剤で抑制する遺伝子調節剤を開発することにある。導入されたマウス乳癌ウイルス(BSTV)遺伝子の発現がコルタコイドにより制御されているマウス乳癌細胞を用い、BSTV遺伝子発現にはクロマチンタンパク質でのポリADP-リボース反応が引き金となっていることが見出されている。即ち、ポリADP-リボースが分解されることにより、その部分のクロマチン構造の局所変化が、最終的にはRNAポリメラーゼのプロモーターへの結合と転写促進につながると考

えられている。(ジャーナル・バイオロジカル・ケミストリー、258:15371(1983))。

そこで、発明者はポリADP-リボースの分解を阻害すれば、遺伝因子が癌化されなくなるということが予想されたため、ADP-リボースの分解に関与する酵素であるポリ(ADP-リボース)グリコヒドロラーゼをヒト胎盤より分離精製し、本酵素に対し阻害作用をもつ化合物を設計した結果、幾つかの天然化合物に強い阻害作用を見出した。

また、この化合物には癌腫増殖因子(TNF)のもつ癌腫増殖作用と癌腫分化誘発作用を抑制する全く新しい特性があることを見出し、この癌腫増殖因子がTNF受容体へのTNFの結合親和性を高めることに起因することも突き止めた。さらに、この化合物にはマクロファージからのTNF、インターロイキン1の産生を抑制する作用があることを見出した。そして、さらに設計を進め、ポリ(ADP-リボース)グリコヒドロラーゼ阻害、及びTNFをはじめとするサイトカインの誘導およびそれらの作用増強効果に基づく抗癌作用を有

する阻害剤として、使用に供せうる新規化合物を見出し、本発明を完成した。

(癌腫を抑制するための手段)

即ち、本発明は次の性質を有するものである。

① 以下に示す性質を有するリグニン配糖体

- (i) リグニンおよび多糖部分が結合
- (ii) 分子量は80000~140000
- (iii) リグニンと多糖部分の割合は1:1~20:1(分子比)
- (iv) 多糖部分はウロン酸60~70%、中性糖30~40%で構成されている。

② リグニン配糖体を主成分とするポリ(ADP-リボース)グリコヒドロラーゼ阻害剤。

③ リグニン配糖体を主成分とするサイトカイン、すなわち癌腫増殖因子(TNF)作用増強剤。

④ リグニン配糖体を主成分とするサイトカイン(TNF、IL-1)の産生阻害剤。

⑤ リグニン配糖体を主成分とする(TNFなどのサイトカインとの併用による)癌腫増強剤。

本発明のリグニン配糖体は、リグニンと糖(多

糖)との結合体である。リグニンと糖(多糖)との割合はエーテル結合による。その割合は、リグニン:多糖部分の重量比で1:1~20:1程度が例示される。また、リグニンと多糖部分との分子比で1:1~20:1程度が例示される。

リグニン配糖体の糖部分はウロン酸および中性糖より構成される。その組成としてはウロン酸60~70%、中性糖30~40%程度が例示される。

中性糖としては、グルコース、ガラクトース、マンノース、アラビノースが挙げられる。その組成としてはグルコース15~20mol%、ガラクトース25~30mol%、マンノース35~50mol%、アラビノース10~15mol%程度が例示される。

これらの組成等は全体として糖組成を取っており、多糖部分を形成する。

リグニン配糖体の分子量は80000~140000程度であり、多糖部分の分子量は10万~100万程度である。またリグニン部分は分子量1000~10000程度を有する。

特開平 3-205402(3)

本発明のリグニン配糖体は、元素的にはC原子38〜43重量%、H原子1〜10重量%、O原子43〜54重量%組成が例示される。

本発明のリグニン配糖体は以下のように調製される。

出発原料としては高（重・質）、糖類、五炭糖、糖類人參、松（かさ・葉）、草みづら（幹）等が挙げられる。

原料を各種溶媒（例えば、熱水、エタノール、アセトン等）で抽出する。抽出時間は1〜15時間程度である。抽出液と原料をアルカリ性溶液（0.1〜1N水酸化ナトリウム、アンモニウム等）で抽出する。抽出液をpH4〜6に調整し、1〜5倍量のエタノールを添加して沈澱物を回収する。沈澱物をゲル濾過で精製して糖性部分を回収する。

こうして得られたリグニン配糖体は湯が、遠心分離、凍乾燥等を行うことができる。

本発明のリグニン配糖体は、ポリ（ADP-リボース）グリコヒドロラーゼ阻害作用、及びTNF

Fの産生誘導およびその作用の増強、基質、ヒトを含む哺乳動物（ヒト、ウマ、イス、マウス、モルモット、ラット等）に対してポリ（ADP-リボース）グリコヒドロラーゼ阻害活性、及びTNFの産生誘導およびその作用の増強増進作用として腫瘍細胞、ウイルス性感染症の治療、予防に有用なものである。

本発明のリグニン配糖体は、液口内または非液口的に投与される。

リグニン配糖体は、それ自体または製剤上許容されるキャリアとの懸濁液調剤の形で投与される。当該懸濁液は、投与経路の方法によって調整される。剤型としては、錠剤、カプセル剤、散剤、針剤、注射剤等が例示される。

リグニン配糖体は、例えば、液口投与の場合、通常0.1〜1000mg/体重を投与量として1日1回または数回にわたって投与されるが、年齢、体重、および/または処置すべき病状の重症度や治療に對す

る反応によりその投与量は変わらう。

毒性試験

本発明のリグニン配糖体のマウスに対する毒性は、いずれも経口投与でLD₅₀値が1000mg/kg以上であり、投与量に比べてLD₅₀値が極めて大きく、安全度の高い化合物である。

〔実施例〕

実施例1

以下の処置に付すことによってリグニン配糖体を抽出した。

例

松かさ

↓熱水抽出 乾燥した松かさの葉、または水の量により異なるが通常3時間×3回行う。

↓エタノール抽出 熱水抽出した松かさを半乾状態のまゝエタノールに浸し一昼夜室温に置く。

↓アセトン抽出 エタノール抽出した松かさを

半乾状態のままアセトンに

浸し一昼夜室温に置く。

0.3N水酸化ナトリウム（又はアンモニア）抽出

抽出

アセトン抽出した松かさをランプにて乾燥させ、0.3N水酸化ナトリウム溶液にて6時間（又は一昼夜）浸しながらか抽出する。この抽出液に糖量を加えてpHを5.0に調ず。沈澱物は高速遠心により除去する。

↓エタノール抽出 抽出液に等量のエタノールを加え室温に一昼夜置く。沈澱物を高速遠心により除去する。沈澱物を水に溶かし水に対して透析する。

特開平 3-205402(4)

↓ 凝縮反応 過剰の糖液を揮発乾燥にて除去にする。

↓ ゲル透過 蔗糖凝縮液をセファロース (Sephacrose) CL-4Bにて精製する (移動相は0.1N NaOH)。糖性フラクションを集め、砂糖を加えてpHを5.0に調した後、1倍量のエタノールを加えて水中に1〜2時間置き、沈殿を高速遠心より採取する。沈殿物を10%エタノールに溶かし、トールパールHW-40Fにて8μに精製する (移動相は10%エタノール)。糖性フラクションを集め、水に對して濃縮した後、凍結乾燥により製氷にする。

実施例2

11

中性糖としてはグルコース、ガラクトース、マンノース、アラビノースを含むがフコースは含まない。

α) クロロン糖はカルバゾール法、中性糖はフェノール硫酸法で定量した。

β) 中性糖の組成はメタノリシスで生成するメチルグリコシドをトリメチル化した後ガスクロマトグラフィーで分析した。

(アグリコンの分析)

分子重: セファロース (Sephacrose) CL-4B ゲル透過柱により4000±2000

赤外吸収分析 (IR)

IRはKBrディスクにより測定した。

その結果、3500〜3700 cm⁻¹ 範囲に3400 cm⁻¹ にピークをもつ吸収が検出された。この吸収はフェノール性水酸基の存在を示す。1600 cm⁻¹ 付近の吸収は芳香族二重結合を示す。1700 cm⁻¹ 付近にカルボニル基の吸収がないことよりタンニンに見られるようなエステル結合はなく、リグニンに見られるようなエーテル結合で重合している

13

リグニン配糖体の糖部分、グリコン (glycone)

及び非糖部分、アグリコン (aglycone) の構造の特徴を検討するために、本配糖体をメタノリシス

(メタノール-塩酸分解)、あるいは過塩素酸法 (NaClO₂) 法によりグリコンとアグリコンに分離して分析を行った。その結果は次の通りである。

(グリコンの分析)

分子重: セファロース (Sephacrose) CL-4Bゲル透

過柱により60000〜100000

糖組成 (%) (全糖量%)

クロロン糖 63.4 48.8

中性糖 35.5 28.2

グリコンの2/3がクロロン糖であるという特

徴を持つ。

中性糖の組成 (%) (mol %)

グルコース 18.2

ガラクトース 27.4

マンノース 40.2

アラビノース 13.8

フコース 0

12

化合物であることを示す。

凍結乾燥も含めて全体のスペクトラムはリグニン (アルカリ) と極めて類似している。

以上のIRスペクトルの結果から本配糖体のアグリコンはタンニン糖化合物ではなく、リグニン糖化合物であると推定される。

紫外吸収 (UV) 分析

280 nmに最大吸収値、260 nmに最小吸収値をもつ。

280/260=1.02

リグニンも同様のUVスペクトルをもつ

280/260=1.03

UVスペクトルにより芳香族 (おそらくフェノール) の存在を示す。

電子スピン共振 (ESR) 分析

リグニンと同様にg=2.004 ESRシグナルが検出されることより安定なフリーラジカルを有する糖部分を含むことを示す。なお、タンニンにはこの様なシグナルは見られない。

(リグニン配糖体の分析)

14

特開平 9-205402(5)

リグニン配糖 全体としての特徴

元素分析 (weight%)

C	59.83
H	4.41
O	55.73
N	0.03以下
S	0

糖、糖質を含有しないことより蛋白、糖脂質を含まずセファロース (Sephacrose) C1-4B ゲル組成物による分子量は約11万である。

リグニンと糖の結合比は重量比で約1:4である。

従って本配糖体は、糖部分(グリコン)としてクロン酸を全重量の約50%も含有するという特徴をもっている。中核糖としてはグルコース、ガラクトース、マンノース、アラビノースを含む。糖部分(アグリコン)はリグニンより成るという特徴を有する。

本配糖体は糖の還元末端ラクトール水酸基がリグニンのアルコール性またはフェノール性水酸基

と脱水縮合してエーテル状に縮合したO-配糖体である。また、リグニンと糖の結合比が重量比で約1:4であり、特に、糖性糖のクロン酸を多く含有する、分子量約11万のリグニン配糖 (アグリコン)の特徴で分類した場合)である。

本配糖体の特定構造モデルは図面に示す通りである。

試験例1.

ポリ(AOP-リボース)グリコヒドロラーゼに対する阻害効果

7℃で用いたバッファー(0.01Mキサンタンアルブミン-10mMナトリウムエタノール-50mMリウム・リン酸、pH7.0)に、³H-(AOP-リボース)...を加え、その27%に糖質物質およびヒト胎盤より調製した膜由来、ポリ(AOP-リボース)グリコヒドロラーゼ溶液を加えて全容30%とした後、37℃にて1時間インキュベーションした。その後、0.8%硝酸に反応性を検出させ、水、エタノール、アセトンで糖質を洗淨した後、それを乾燥させ、液体シンチレ

15

ーションカウンターにて、未反応物質³H-(AOP-リボース)を測定し、本物質に対する試験物質の阻害作用を検討した。その結果を示したのが表1であり、用いた試験物質の全てが、阻害作用的にポリ(AOP-リボース)グリコヒドロラーゼを阻害した。

表1

リグニン配糖体のポリ(AOP-リボース)グリコヒドロラーゼ阻害効果

リグニン配糖体濃度 (mg/ml)	ポリ(AOP-リボース) グリコヒドロラーゼ活性(%)
0	100
1	83
3	48
10	17
30	8

試験例2

16

遺伝子発現に対する阻害効果

本試験で用いた遺伝子発現系は、遺伝コルチコイド感受性遺伝子である、マウス乳癌ウイルス(MMTV)遺伝子を持つ、マウス乳癌細胞である3Y1株を用いた。本物質は、遺伝コルチコイド存在下において、385 RNAと、同時にスプライシングを受けた243 RNAの2種類の発現する。この発現は、90%の90%を用いることにより増大することが出来る。そこで、3Y1株に試験物質を30%/mlとなる様に加え、37℃、30分間インキュベーションし、次に、その系に10⁻⁸Mとなる様にデキサメタゾンを加え、さらに1時間インキュベーションした。その後、341細胞を採取、高分子RNAをグアニジン-塩酸法で抽出、80℃で5分間処理(20mMOPS, pH7.0, 5mM 硫酸ナトリウム, 1mMEDTA)後、1.2%アガロース・ゲル(用バッファー)にて、電気泳動(40V, 16h)を行った。その後、ニトロセルロースへトランスファーし、³²P-MMTV-DNA(5'に 5'末端cDNA)をハイブリダイズし、

17

18

特開平 3-205402(5)

X線フィルムによるオートラジオグラムを作成した。その後、オートラジオグラムより35Sおよび24S RNAのバンドの強度をデンストメーターで測定することにより、RNA複製量を測定し、複製物質の濃度の変化と比較して、RNA複製抑制割合を算出した。その結果を示したのが表2であり、用いた複製物質はHTV遺伝子複製抑制作用を示した。

表2

リグニン配糖体の乳癌ウイルス(MMTV)遺伝子複製に対する作用

	デキサメタゾン (10^{-6} M)	リグニン配糖体 (30 μ g/皿)	35S, 24S バンドの感光度
1	+	-	++++
2	-	+	+
3	-	-	+
4	+	+	++

19

リグニン配糖体は移植日翌日から4日間連続投与した。

試験例4.

マウス乳腺芽腫細胞L-929に対するTNF作用の増進効果

TNFのもつ細胞増殖作用はL-929細胞のシャーレへの接着性を利用し、生き残った細胞を染色してその染色強度を測定することにより測定することができる。そこでL-929細胞に複製物質を加え、次にアクリノマイシンDを4 μ g/皿になる様に添加し、さらにTNFを加え、37で、18時間インキュベーションする。その後、プレート中の細胞を0.5%クリスタルバイオレットで染色し、染色された細胞を0.5%SDSにより溶解し、その色密度をOD 690 nmで測定し、TNF作用に対する増進効果を検討した。その結果を示したものが表3であり、用いた複製物質の全てが、局所的にTNFの細胞増殖作用を増進した。

21

1は陽性対照、2, 3は陰性対照、4は実験試験例3。

マウス乳腺細胞に対する増進効果

マウスの乳腺内に、デルコーマ180細胞移植を 1×10^5 個移植し、移植後1~4日間複製物質を乳腺内に連続投与した。試験増進性は、生体全量投与率との比較による割合率より求めた。移植後45日目にて実験終了とした。その結果を示したのが表3であり、用いた複製物質は増進作用を示した。

表3

マウス乳腺デルコーマ180に対するリグニン配糖体の増進作用

試験	Dose (μ g/皿)	T/C (%)
ナシ		100
リグニン配糖体	40 \times 4	108
	20 \times 4	206
	10 \times 4	120
	5 \times 4	91

20

表4

マウス乳腺芽腫細胞L-929に対するTNF作用の増進効果

リグニン配糖体濃度 (μ g/皿)	TNFのCD _{0.5} 濃度 (μ g/皿)	増進率 (%)
0	0.034	100
3	0.016	221
10	0.0063	543
30	0.0044	773
100	0.0074	458

試験例5

マウス乳腺細胞に対するTNF作用による増進効果

マウスの皮下にデルコーマ180細胞移植を 1×10^5 個移植し、移植後1~5日間複製物質およびTNFを連続投与した。試験増進性は生体全量投与率との比較による割合率より求めた。移植後45日目にて実験終了とした。その

22

特開平 3-205402(7)

結果を示したのが表であり、用いた被験物質は
TNFとの併用により強い効果 用を した。

表 3

マウス腫瘍ザルコーマ180に対するリグニン
配糖体とTNFの併用による効果

試料	濃度 (mg/kg)	T/C (%)
0		100
TNF		118
TNF+	40×4	191
リグニン配糖体	20×4	298
	10×4	254
	5×4	188

リグニン配糖体はTNFとともに毎日投与
から4日間毎日投与した。

4. 図面の簡単な説明

図面は本発明リグニン配糖体の構造様式を示す。

1: 糖

2: リグニン

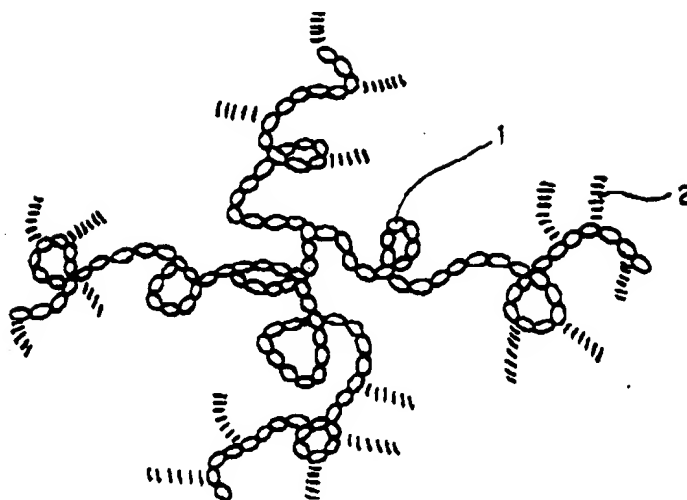
特許出願人 株式会社 ミヨシ十中

代 理 人 弁 理 士 高 島 一



23

24



THIS PAGE BLANK (USPTO)

THIS PAGE BLANK (USPTO)